

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Adapun alat yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada **Tabel 1**.

Adapun gambar alat yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada **Lampiran 1**.

Tabel 1. Alat yang Digunakan Penelitian

No.	Alat	Fungsi
1.	Cawan petri	Sebagai wadah perlakuan uji difusi cakram.
2.	Tabung reaksi	Sebagai wadah peremajaan bakteri pada agar miring dan pada media cair, sebagai wadah NaFis 0,9% saat pengenceran dan sebagai uji MIC.
3.	Pipet volume	Sebagai alat untuk mengambil larutan dengan volume 1-10 ml.
4.	Bola hisap	Sebagai alat penghisap larutan saat pengambilan dengan pipet volume.
5.	Destruktor	Sebagai alat untuk pemusnahan mikroorganisme setelah perlakuan.
6.	Jangka sorong digital	Sebagai alat untuk mengukur diameter zona bening.
7.	<i>Rotary Vacuum Evaporator</i>	Sebagai alat evaporasi hasil maserasi hingga menjadi ekstrak dalam bentuk pasta.
8.	Spatula besi	Sebagai alat untuk mengambil ekstrak pada bola kaca <i>rotary vacuum evaporator</i> dan sebagai pengaduk media.
9.	Gunting	Sebagai alat untuk memotong benang kasur.
10.	<i>Vortex mixer</i>	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan.
11.	<i>Yellow tip</i>	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam volume tertentu, digunakan dengan Mikropipet 10-100 µl.

12. <i>Blue tip</i>	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam volume tertentu menggunakan Mikropipet 100-1000 µl.
13. <i>Laminar Air Flow</i> (LAF)	Sebagai tempat perlakuan dalam kondisi steril.
14. <i>Hot plate</i>	Sebagai pemanas saat pembuatan media.
15. Lemari pendingin	Sebagai tempat penyimpanan bakteri dan bahan penelitian.
16. Jarum ose	Sebagai alat untuk pengambilan dan peletakkan bakteri pada media.
17. Oven	Sebagai alat untuk mengeringkan peralatan kaca setelah proses sterilisasi.
18. Autoklaf	Sebagai alat untuk sterilisasi alat dan bahan dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.
19. Inkubator	Sebagai alat inkubasi bakteri pada suhu ruang.
20. Mikropipet 100-1000 µl	Sebagai alat untuk mengambil larutan sebanyak 100-1000 µl.
21. Mikropipet 10-100 µl	Sebagai alat untuk mengambil larutan sebanyak 10-100 µl.
22. Rak tabung reaksi	Sebagai wadah untuk meletakkan tabung reaksi.
23. Gelas Ukur	Sebagai alat untuk menakar bahan cair.
24. <i>Beaker glass</i>	Sebagai wadah tabung reaksi, <i>blue tip</i> dan <i>yellow tip</i> saat sterilisasi.
25. Pinset	Sebagai alat untuk mengambil kertas cakram.
26. <i>Sprayer</i>	Sebagai wadah alkohol 70%.
27. Nampan	Sebagai wadah alat dan bahan.
28. Corong kaca	Sebagai alat penyaringan larutan maserasi.
29. Spatula kaca	Sebagai alat pengaduk bahan.
30. Erlenmeyer	Sebagai wadah hasil maserasi yang sudah disaring dan sebagai wadah pembuatan media.
31. <i>Triangle</i>	Sebagai alat untuk meratakan bakteri pada media agar.
32. Bunsen	Sebagai alat pembakaran dalam pengkondisian aseptis.
33. Botol film	Sebagai wadah ekstrak tanaman dalam bentuk

	pasta dan wadah pengenceran konsentrasi ekstrak.
34. Toples kaca 1,5 liter	Sebagai wadah maserasi daun daun dewa (<i>G. segetum</i> (Lour.) Merr).
35. Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-3} .
36. Blender	Sebagai penghalus daun daun dewa (<i>G. segetum</i> (Lour.) Merr).
37. <i>Spectrophotometer</i>	Sebagai pengukur panjang gelombang saat Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>).
38. Lap Kering	Untuk mengeringkan alat-alat yang telah dicuci.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian disajikan dalam **Tabel 2**. Adapun gambar alat yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada **Lampiran 2**.

Tabel 2. Bahan yang Digunakan Penelitian

No.	Bahan	Kegunaan
1.	Daun Dewa (<i>G. segetum</i> (Lour.) Merr)	Sebagai bahan ekstrak yang akan diujikan daya hambatnya.
2.	Bakteri <i>P. fluorescens</i>	Sebagai objek penelitian.
3.	Ethanol p.a. 96%	Sebagai bahan pelarut saat proses maserasi.
4.	Media TSB (<i>Tryptone Soy Broth</i>)	Sebagai media cair untuk peremajaan bakteri dan perlakuan uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>).
5.	Media PSA (<i>Pseudomonas Selective Agar</i>)	Sebagai media agar peremajaan bakteri dan perlakuan pada cawan petri.
6.	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak saat pembuatan dosis.
7.	Alkohol 70%	Sebagai cairan aseptis sebelum perlakuan.
8.	Akuades	Sebagai bahan pelarut pembuatan media dan NaFis 0,9%.
9.	Kertas saring	Sebagai bahan untuk menyaring larutan hasil maserasi.

10. Masker	Sebagai bahan untuk melindungi mulut dan hidung agar terhindar kontaminasi.
11. Spirtus	Sebagai bahan bakar bunsen.
12. Es batu	Sebagai pendingin <i>rotary vacum evaporator</i> .
13. Kertas label	Sebagai pemberian tanda pada alat dan bahan.
14. Kapas	Sebagai penutup lubang alat pada proses sterilisasi.
15. <i>Aluminium foil</i>	Sebagai penutup badan toples pada saat maserasi dan sebagai penutup lubang alat yang akan disterilisasi.
16. <i>Plastic wrap</i>	Sebagai penutup cawan petri setelah diberi perlakuan saat akan diinkubasi.
17. Benang kasur	Sebagai pengikat alat saat proses sterilisasi.
18. <i>Tissue</i>	Sebagai bahan untuk mengeringkan alat setelah dicuci.
19. Kertas cakram	Sebagai bahan penyerap ekstrak untuk mengetahui zona hambatan dari ekstrak yang digunakan.
20. Vaseline	Sebagai pelumas penutup <i>rotary vacum evaporator</i> .
21. Kertas bekas	Sebagai bahan pembungkus alat kaca yang akan disterilisasi.
22. NaCl 2%	Sebagai bahan campuran pembuatan media PSA (kontrol salinitas untuk bakteri <i>P. fluorescens</i>) dan pembuatan NaFis 0,9%.
23. Sarung tangan	Sebagai bahan untuk melindungi tangan agar terhindar dari kontaminasi dan reaksi bahan kimia.
24. Korek api	Sebagai sumber api untuk menyalakan bunsen.
25. Plastik 2 kg	Sebagai pembungkus cawan petri dan tabung reaksi saat akan dimasukkan dalam kulkas dan destruktur.
26. Karet gelang	Sebagai pengikat plastik.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Eksperimen adalah observasi dibawah kondisi buatan (*artificial condition*) dimana kondisi tersebut dibuat dan diatur oleh si peneliti. Dengan demikian, penelitian eksperimental adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol. Metode eksperimen sering sekali dilakukan dalam penelitian ilmu-ilmu eksakta. Walaupun demikian, penggunaan metode eksperimen didalam ilmu sosial akhir-akhir ini semakin banyak peminatnya. Tujuan dari penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta berapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan (Nazir, 2014).

Sedangkan menurut Singarimbun dan Effendi (1989), penelitian eksperimen sangat sesuai untuk pengujian hipotesa tertentu dan dimaksudkan untuk mengetahui hubungan sebab akibat variabel penelitian. Pelaksanaannya memerlukan konsep dan variabel yang jelas sekali dan pengukuran yang cermat. Penelitian eksperimen mungkin dilakukan di laboratorium, di kelas atau di lapangan. Kiranya jelas bahwa lebih mudah melakukan eksperimen di laboratorium daripada di lapangan, karena alat-alat yang khusus dan lengkap dapat tersedia di laboratorium dan pengaruh luar dapat mudah dicegah selama eksperimen berlangsung. Dalam penelitian eksperimen yang tidak menggunakan kelompok kontrol hasil penelitian tersebut diragukan keabsahannya, karena beberapa variabel yang mengancam atau yang melemahkan validitas penelitian tidak dikontrol.

3.3 Pengambilan Data

Menurut Bungin (2007), observasi atau pengamatan adalah kegiatan keseharian manusia dengan menggunakan pancaindra mata sebagai alat bantu utamanya selain pancaindra lainnya seperti telinga, penciuman, mulut, dan kulit. Karena itu, observasi adalah kemampuan seseorang untuk menggunakan pengamatannya melalui hasil kerja pancaindra serta dibantu dengan pancaindra lainnya. Metode observasi adalah metode pengumpulan data yang digunakan untuk menghimpun data penelitian melalui pengamatan dan pengindraan. Suatu kegiatan pengamatan baru dikategorikan sebagai kegiatan pengumpulan data penelitian apabila memiliki kriteria sebagai berikut:

- a. Pengamatan digunakan dalam penelitian dan telah direncanakan secara serius.
- b. Pengamatan harus berkaitan dengan tujuan penelitian yang telah ditetapkan.
- c. Pengamatan dicatat secara sistematis dan dihubungkan dengan proporsisi umum dan bukan dipaparkan sebagai suatu yang hanya menarik perhatian.
- d. Pengamatan dapat dicek dan dikontrol menggunakan keabsahannya.

Observasi yaitu melakukan pengamatan secara langsung ke objek penelitian untuk melihat dari dekat kegiatan yang dilakukan. Apabila objek penelitian bersifat perilaku dan tindakan manusia, fenomena alam (kejadian-kejadian yang ada di alam sekitar), proses kerja, dan penggunaan responden kecil (Riduwan, 2003). Sedangkan menurut Nasution (2012), Ilmu pengetahuan mulai dengan observasi dan selalu harus kembali kepada observasi untuk mengetahui kebenaran ilmu itu. Observasi juga dilakukan bila belum banyak keterangan dimiliki tentang masalah yang kita selidiki. Observasi diperlukan untuk menjajaknya. Jadi berfungsi sebagai eksplorasi. Dari hasil ini kita dapat

memperoleh gambaran yang lebih jelas tentang masalahnya dan mungkin petunjuk-petunjuk tentang cara memecahkannya. Observasi sebagai alat pengumpul data harus sistematis artinya observasi serta pencatatannya dilakukan menurut prosedur dan aturan-aturan tertentu sehingga dapat diulangi kembali oleh peneliti lain. Selain itu hasil observasi itu harus memberi kemungkinan untuk menafsirkannya secara ilmiah.

3.4 Rancangan Penelitian

Untuk dapat memilih rancangan percobaan yang paling sesuai pemahaman tentang kaidah perancangan percobaan itu sendiri harus dikuasai terlebih dahulu. Bila bahan atau lingkungan percobaan dapat dianggap homogen, kita gunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), Pengacakan perlakuan dalam suatu percobaan dilakukan secara lengkap tanpa pilih-pilih karena adanya jaminan homogenitas bahan dan lingkungan percobaan (Sugito, 2009). Menurut Gaspersz (1991), RAL (Rancangan Acak Lengkap) merupakan rancangan yang paling sederhana diantara rancangan-rancangan percobaan yang baku. Jika kita ingin mempelajari t buah perlakuan dan menggunakan r satuan percobaan untuk setiap perlakuan atau menggunakan total rt satuan percobaan, maka RAL membutuhkan kita mengalokasikan t perlakuan secara acak kepada rt satuan percobaan. Pola ini dikenal sebagai pengacakan lengkap atau pengacakan dengan tiada batasan. RAL dipandang lebih berguna dalam percobaan laboratorium, dalam beberapa percobaan rumah kaca, atau dalam percobaan pada beberapa jenis bahan percobaan tertentu yang memiliki sifat relatif homogen. Dalam RAL, data percobaan diabstraksikan melalui model:

$$\begin{aligned} Y_{ij} &= u_i + \epsilon_{ij} = \text{nilai tengah perlakuan} + \text{pengaruh acak} \\ &= u + (u_i - u) + \epsilon_{ij} \\ &= u + \tau_i + \epsilon_{ij} ; i = 1, 2, \dots, t \\ &\quad j = 1, 2, \dots, r_i \end{aligned}$$

dimana:

u : nilai tengah populasi (*population mean*)

$\tau_i = (u_i - u)$: pengaruh aditif (koefisien regresi parsial) dari perlakuan ke- i .

ϵ_{ij} : galat percobaan dari perlakuan ke- i pada pengamatan ke- j .

Penelitian ini dilakukan dengan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang menggunakan variable bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) dengan perlakuan yang diberikan adalah dosis ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) yang berbeda terhadap bakteri *P. fluorescense* yang diamati selama 48 jam. Dasar penelitian ini adalah untuk menguji dosis ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) yang berbeda pada media agar padat yang telah diinokulasi bakteri *P. fluorescens*, yang kemudian timbul respon berupa zona bening yang diameternya diukur dengan satuan millimeter (mm). Dalam penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dosis ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) dengan 3 kali pengulangan, kontrol positif dengan pemberian dosis ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) 100% dan kontrol negatif dengan pemberian DMSO 10%. Sebelum dilaksanakan penelitian inti dilakukan penelitian pendahuluan dengan 5 perlakuan dan Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebagai acuan penentuan dosis penelitian inti dan adapun perlakuan penelitian disajikan pada **Tabel 3** dan denah rancangan penelitian yang dilakukan disajikan pada **Gambar 3**.

Tabel 3. Perlakuan Penelitian

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
D	D1	D2	D3
E	E1	E2	E3
K+			
K-			

Keterangan:

A : Perlakuan dosis 1.000 ppm.

B : Perlakuan dosis 1.500 ppm.

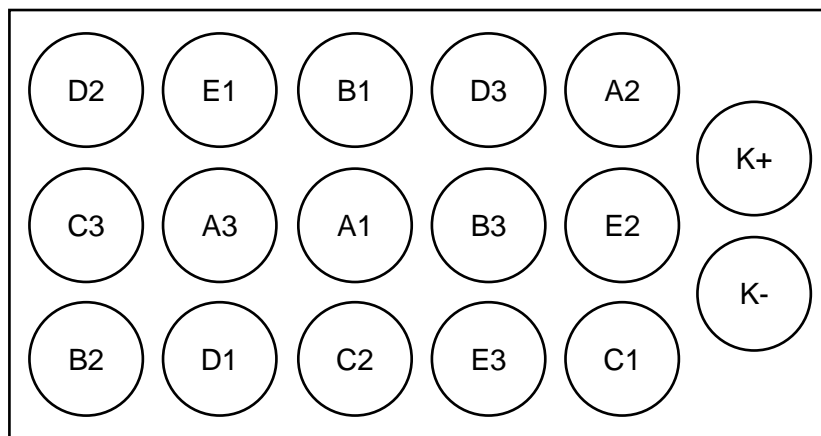
C : Perlakuan dosis 2.000 ppm.

D : Perlakuan dosis 2.500 ppm.

E : Perlakuan dosis 3.000 ppm.

K+ : Perlakuan dosis 100%.0 ppm

K- : Perlakuan DMSO 10%.0 ppm



Gambar 3. Denah Rancangan Penelitian

Keterangan:

A, B, C, D, E : Perlakuan

1, 2, 3 : Ulangan

K+ : Kontrol Positif

K- : Kontrol Negatif

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

a. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr)

Pembuatan ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) disiapkan serbuk daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) kering sebanyak 500 gram yang diperoleh dari Balai Medika Tanaman Obat Batu, Jawa Timur, kemudian serbuk daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) kering dihaluskan lagi dengan menggunakan *blender*. Bila dirasa cukup halus, kemudian dilakukan proses untuk menghasilkan ekstrak kasar dengan menggunakan metode *maserasi* dengan perbandingan pelarut 1:3, dimana serbuk daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) sebanyak 500 gram direndam menggunakan 1500 ml pelarut ethanol p.a 96% selama 3 x 24 jam dalam suhu ruang. Selama proses perendaman 3 x 24 jam, dilakukan pengadukan dengan menggoyangkan toples kaca sebagai wadah *maserasi* untuk membantu proses pengikatan sari daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) oleh pelarut ethanol. Larutan yang diperoleh dari hasil *maserasi* kemudian disaring menggunakan kertas saring dan corong kaca, kemudian larutan hasil *maserasi* dilakukan evaporasi menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan 80 rpm, proses evaporasi membutuhkan waktu ± 8 jam hingga menghasilkan ekstrak dalam bentuk pasta sebanyak 5 gram yang kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan wadah botol film untuk mencegah rusaknya ekstrak. Adapun skema pembuatan ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) disajikan pada **Lampiran 3**.

b. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan yang dilakukan menggunakan autoklaf listrik.

Adapun tahap sterilisasi yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- Alat yang sudah dicuci dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau dimasukkan kedalam oven dengan suhu 50°C selama ± 40 menit, kemudian alat yang sudah kering ditutup semua lubangnya dengan kapas dan dibungkus menggunakan kertas yang diikat rapat menggunakan karet gelang atau benang kasur. Kemudian bahan yang akan disterilisasi dimasukkan dalam erlenmeyer atau *beaker glass* yang kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil.
- Dimasukkan alat dan bahan kedalam autoklaf lalu autoklaf ditutup secara diagonal dan dikencangkan bautnya, pastikan klep pada tutup autoklaf terbuka. Lalu dipastikan autoklaf sudah tersambung dengan sumber listrik.
- Ditekan tombol ON, lalu putar suhu maksimal hingga lampu *heating* menyala warna hijau, setelah keluar uap dari klep lalu klep ditutup. Kemudian, setelah jarum penunjuk suhu menunjukkan angka 121°C tekanan 1 atm, diturunkan suhu hingga lampu *sterilizing* menyala kuning dan diputar *timer* selama 15 menit untuk mempertahankan suhu tersebut selama 15 menit. Setelah 15 menit, alarm akan berbunyi sebagai tanda berakhirnya sterilisasi, lalu autoklaf dimatikan dan tunggu hingga jarum penunjuk suhu menunjukkan angka 0°C, lalu buka klep sampai tidak ada uap yang keluar. Kemudian, buka tutup autoklaf secara diagonal dan keluarkan alat serta bahan yang disterilisasi.
- Alat yang sudah disterilisasi dimasukkan ke dalam oven untuk menghilangkan uap yang tersisa. Pengovenan dilakukan dengan suhu

50°C selama ± 40 menit. Sedangkan bahan yang sudah disterilisasi dapat langsung digunakan atau disimpan dalam lemari pendingin.

c. Sterilisasi Tempat Perlakuan

Sterilisasi tempat perlakuan dilakukan mengingat bahwa tempat perlakuan digunakan secara bergantian sehingga untuk menghindari kontaminasi dilakukan sterilisasi secara kimia dengan penyemprotan alkohol 70% di sekitar tempat yang akan digunakan. Selain itu, sterilisasi secara fisika dengan menggunakan penyinaran *ultraviolet* (UV) sebelum penggunaan LAF (*Laminary Air Flow*) selama 15 menit sebelum dan sesudah dilakukannya perlakuan dengan tujuan mematikan semua organisme didalamnya agar tidak terjadi kontaminasi.

d. Pembuatan Media Perlakuan

- **Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)**

Media agar miring yang digunakan untuk peremajaan bakteri adalah media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*). Adapun prosedur pembuatan media agar miring adalah sebagai berikut:

- Ditimbang media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) sebanyak 17,324 gram dan NaCl 2% sebanyak 7,1 gram dengan timbangan digital. Kemudian media dan NaCl 2% dimasukkan dalam erlenmeyer 1000 ml, lalu dituang aquades sebanyak 355 ml dan dilarutkan diatas *hot plate* hingga mendidih.
- Media yang sudah larut, dituang pada 2 tabung reaksi masing-masing sebanyak 7,5 ml dan tutup lubang tabung reaksi dengan kapas.
- Kemudian dimasukkan tabung reaksi dalam wadah *beaker glass* yang dasarnya sudah diberi kapas dan ditutup *beaker glass* dengan *aluminium foil*.

- Media pada tabung reaksi dan sisa media pada erlenmeyer kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- Setelah steril, tabung reaksi yang berisi media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) dimiringkan dan ditunggu hingga membentuk agar. Sisa media digunakan untuk perlakuan pada cawan petri dengan menuangkan sebanyak 20 ml media pada 17 cawan petri.

- **TSB (*Tryptone Soy Broth*)**

Media TSB (*Tryptone Soy Broth*) adalah media cair yang digunakan untuk pembiakan bakteri *P. fluorescens*, media ini digunakan untuk proses pengenceran bakteri dan penanaman bakteri dengan metode sebar ataupun penanaman untuk Uji MIC. Adapun prosedur pembuatan media cair sebagai berikut:

- Ditimbang media TSB (*Tryptone Soy Broth*) sebanyak 0,9 gram dan NaCl 2% sebanyak 0,6 gram menggunakan timbangan digital. Kemudian media dan NaCl 2% dimasukkan dalam Erlenmeyer 50 ml dan dilarutkan dengan aquades 30 ml.
- Setelah larut, dituang media cair dalam tabung reaksi sesuai kebutuhan tiap tabung reaksinya dan ditutup lubang tabung reaksi dengan kapas. Kemudian dimasukkan tabung reaksi kedalam *beaker glass* yang dasarnya sudah diberi kapas, lalu *beaker glass* ditutup dengan *aluminium foil* dan disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- Setelah steril, media cair didinginkan kemudian siap digunakan untuk kultur bakteri yang diambil dari inokulan pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) miring menggunakan jarum ose. Media yang tidak digunakan bisa disimpan dalam lemari pendingin.

e. Peremajaan Bakteri *P. fluorescens*

Prosedur yang dilakukan dalam peremajaan bakteri *P. fluorescens* adalah sebagai berikut:

- **Pada Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)**

- Biakan murni bakteri *P. fluorescens* yang diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara disiapkan.
- Disiapkan media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) miring yang sudah siap digunakan, dipanaskan jarum ose hingga berpijar merah pada bunsen yang menyala, kemudian dinginkan jarum ose dengan menempelkan ke media agar biakan murni.
- Setelah jarum ose dingin, diambil bakteri *P. fluorescens* biakan murni dengan menggunakan jarum ose. Kemudian dilakukan strik secara zig-zag pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) miring.
- Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) yang sudah dilakukan strik bakteri *P. fluorescens* disimpan ke dalam inkubator selama 18—24 jam dengan suhu 32°C.
- Rangkaian prosedur dilakukan dalam kondisi steril didalam LAF (*Laminar Air Flow*).

- **Pada Media TSB (*Tryptone Soy Broth*)**

- Disiapkan bakteri *P. fluorescens* yang sudah diremajakan pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*).
- Media TSB (*Tryptone Soy Broth*) yang sudah steril dan sudah suhu ruang disiapkan, dipanaskan jarum ose hingga berpijar merah pada bunsen, kemudian dinginkan jarum ose dengan menempelkan ke media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*).

- Setelah jarum ose dingin, diambil bakteri *P. fluorescense* pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) dengan menggunakan jarum ose. Kemudian dicelupkan jarum ose yang sudah terdapat bakteri *P. fluorescens* kedalam media TSB (*Tryptone Soy Broth*).
- Kemudian dihomogenkan supaya bakteri tumbuh merata dengan menggunakan *fortex mixer*. Lalu media yang sudah terdapat bakteri disimpan kedalam inkubator selama 18—24 jam dengan suhu 32°C.
- Rangkaian prosedur dilakukan dalam kondisi steril didalam LAF (*Laminar Air Flow*).

f. Pembuatan Dosis Ektrak Daun Dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr)

Ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) dalam bentuk pasta diengencerkan dengan pelarut DMSO 10%. Adapun prosedur pembuatan dosis ekstrak kasar adalah sebagai berikut:

- Ekstrak dan DMSO 10% disiapkan, lalu ditentukan dosis yang diinginkan dalam satuan ppm. Adapun perhitungan ppm adalah mg ekstrak:liter DMSO 10%. Perhitungan disajikan pada **Lampiran 4**.
- Dikonversikan liter menjadi mililiter, buat dosis ekstrak tertinggi sebanyak 10 ml sebagai induk.
- Selanjutnya, dosis ekstrak yang lebih kecil dibuat dengan cara pengenceran dari dosis tertinggi dengan rumus $V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$.
- Disimpan konsentrasi ekstrak dalam lemari pendingin.

1.5.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Adapun prosedur uji MIC adalah sebagai berikut:

- Disiapkan bakteri yang sudah dikultur pada media TSB (*Tryptone Soy Broth*) dan 1 tabung reaksi NaFis 0,9%, lalu dilakukan pengenceran 1 kali pada tabung reaksi berisi NaFis.
- Disiapkan 7 tabung reaksi yang sudah berisi media TSB (*Tryptone Soy Broth*) steril sebanyak 4,5 ml.
- 7 tabung reaksi diberi bakteri yang sudah diencerkan pada NaFIs 0,9% masing-masing 100 μ L.
- Kemudian ekstrak daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) diberikan pada 5 tabung reaksi dengan dosis yang berbeda pada setiap tabungnya. Adapun dosisnya terdiri dari 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1.000 ppm. Pada 2 tabung reaksi dijadikan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif diberi antibiotik *oxytetracycline* 30 μ g, sedangkan kontrol negatif hanya pemberian bakteri.
- Lalu dilakukan inkubasi dengan suhu 32°C selama 18—24 jam.
- Setelah masa inkubasi, dilakukan pengukuran absorbansi tiap perlakuan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 365 μ m.
- Nilai absorbansi antara perlakuan dicocokkan dengan nilai absorbansi kontrol positif. Nilai absorbansi yang mendekati kontrol positif artinya memberikan pengaruh sehingga dapat digunakan untuk penentuan dosis pada uji difusi cakram.

b. Uji Difusi Cakram

Adapun prosedur uji difusi cakram adalah sebagai berikut:

- Disiapkan cawan petri diameter 9 cm yang sudah terdapat media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*), dosis ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr), bakteri *P. fluorescens* yang ditanam pada media TSB (*Tryptone Soy Broth*), dan NaFis 0,9% sebagai media pengenceran kepadatan bakteri *P. fluorescens*.
- Direndam kertas cakram (*Blank Disc*) diameter 6 mm dalam dosis ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) sesuai perlakuan selama 15 menit.
- Dilakukan pengenceran bakteri *P. fluorescens* hingga kepadatan 10^7 lalu dihomogenkan NaFis 0,9% dengan campuran bakteri pada media TSB (*Tryptone Soy Broth*) menggunakan *fortex mixer* agar tercampur rata.
- Kemudian bakteri *P. fluorescens* kepadatan 10^7 dari NaFis 0,9% ditanam pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) menggunakan metode sebar dengan volume sebanyak 0,15 ml (150 μ L) lalu diratakan pada seluruh permukaan media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) hingga merata menggunakan *triangle*.
- Kertas cakram yang sudah direndam diambil menggunakan pinset dan ditiriskan. Diletakkan kertas cakram pada permukaan media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*), kertas cakram jangan sampai bergeser karena akan mempengaruhi validasi zona bening yang terbentuk.
- Kemudian cawan petri yang sudah diberi perlakuan dimasukkan kedalam inkubator selama 18—24 jam dengan suhu 32°C, setelah masa inkubasi selesai dilakukan pengukuran diameter daya hambat (zona bening) yang terbentuk menggunakan jangka sorong digital.

—Dicatat hasil pengukuran daya hambat dan analisa data dari diameter zona bening yang terbentuk.

1.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama yang digunakan dalam parameter uji pada penelitian Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) secara *In Vitro* adalah daya hambat yang muncul pada perlakuan pemberian ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) dengan dosis tertentu menggunakan uji difusi kertas cakram dalam bentuk zona bening yang diukur diameternya dengan satuan millimeter (mm).

1.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam parameter uji berupa pengaruh suhu inkubasi yang digunakan dalam pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* selama perlakuan. Bakteri *P. fluorescens* memiliki suhu optimal untuk pertumbuhannya, ketidaksesuaian suhu akan memberikan pengaruh terhadap pertumbuhannya sehingga mempengaruhi keberhasilan penelitian yang dilakukan.

3.7 Analisa Data

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh pemberian ekstrak kasar daun dewa (*G. segetum* (Lour.) Merr) secara *In Vitro* maka dilakukan pengolahan data yang kemudian dianalisa statistik menggunakan analisa keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji F dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon daya hambat dalam bentuk zona bening yang muncul. Apabila hasil uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Terakhir dilakukan uji *polynomial*

orthogonal untuk mengetahui hubungan antar perlakuan dengan daya hambat dalam bentuk zona bening yang akan memberikan hasil pengaruh yang terbaik pada perlakuan.